

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004 年 3 月 4 日 (04.03.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/018521 A1

- (51) 国際特許分類: C07K 16/42, 19/00 (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/010671
- (22) 国際出願日: 2003 年 8 月 22 日 (22.08.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2002-241695 2002 年 8 月 22 日 (22.08.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社
ペプタイドドア (PEPTIDE DOOR CO., LTD.) [JP/JP];
〒370-0073 群馬県 高崎市 緑町1-25-5 丸九緑町ビル
206号 Gunma (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 鈴木 政嗣
(SUZUKI, Masatsugu) [JP/JP]; 〒370-0853 群馬県 高崎
市 下中居町443-1 グリーンハイツNo2 101号 Gunma
(JP).
- (74) 代理人: 松井 茂 (MATSUI, Shigeru); 〒104-0061 東京
都 中央区 銀座八丁目 1 6 番 5 号 銀座森ビル 2 階
Tokyo (JP).
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: ANTI-IDIOTYPE ANTIBODY, METHOD OF CONSTRUCTING THE ANTI-IDIOTYPE ANTIBODY AND METHOD OF PREPARING IDIOTYPE ANTIBODY USING THE ANTI-IDIOTYPE ANTIBODY

(54) 発明の名称: 抗イディオタイプ抗体、該抗イディオタイプ抗体の作成方法、及び該抗イディオタイプ抗体を用いたイディオタイプ抗体の調製方法

(57) Abstract: It is intended to provide an anti-idiotypic antibody which can be conveniently and economically constructed compared with the existing type; a method of constructing the anti-idiotypic antibody; and a method of preparing a target idiotypic antibody using the above-described anti-idiotypic antibody. A substance binding to the antigen-binding site of a first antibody is prepared and this substance is ligated to a second antigen to give a fused antigen. Next, this fused antigen is bonded to a second antibody capable of binding to the second antigen as described above, thereby giving an anti-idiotypic antibody against the first antibody. In a method of preparing a specific idiotypic antibody which comprises inoculating an animal with an anti-idiotypic antibody to the idiotypic antibody and then further inoculating with an antigen of the above idiotypic antibody, the anti-idiotypic antibody as described above is employed. Thus, the target idiotypic antibody can be efficiently obtained.

(57) 要約: 本発明は、従来の方法に比べて簡単且つ安価に作成することのできる抗イディオタイプ抗体、その作成方法、及び該抗イディオタイプ抗体を用いた目的とするイディオタイプ抗体の調製方法を提供する。第1抗体の抗原結合部位に結合する物質を調製し、該物質を第2抗原に連結して融合抗原を作成し、この融合抗原と前記第2抗原に結合する第2抗体とを結合させることにより、前記第1抗体に対する抗イディオタイプ抗体を得る。また、動物に、特定のイディオタイプ抗体に対する抗イディオタイプ抗体を接種した後、前記イディオタイプ抗体の抗原を接種することにより、前記イディオタイプ抗体を調製する方法において、本発明の抗イディオタイプ抗体を用いることにより、効率よく目的とするイディオタイプ抗体を得ることができる。

明 細 書

抗イディオタイプ抗体、該抗イディオタイプ抗体の作成方法、及び該抗イディオタイプ抗体を用いたイディオタイプ抗体の調製方法

技術分野

本発明は、簡単且つ安価に作成できる抗イディオタイプ抗体及びその作成方法に関する。更には、該抗イディオタイプ抗体を用いたイディオタイプ抗体の調製方法に関する。

背景技術

抗原特異性の異なる抗体分子の抗原結合部位の形はそれぞれ異なっており、それぞれの抗体分子に特有の抗原結合部位を有している。このような抗原結合部位は免疫原性を有しており、イディオタイプと呼ばれている。また、この結合部位周辺の免疫原性を有するエピトープは特にイディオトープと呼ばれている。

抗体のイディオトープに対する抗体は、抗イディオタイプ抗体と呼ばれ、古くから生体内での免疫反応を制御していると考えられており（Jerne NJ 著 Ann Immunol (Paris) 1974;125c:373-378 等）、最近では、抗イディオタイプ抗体が、イディオトープを持つ抗体（イディオタイプ抗体）の発現に影響を与えていることが分かっている（「免疫学イラストレイテッド」、117 頁、多田富雄監訳、南江堂、2000 年 2 月 10 日発行）。

現在、抗イディオタイプ抗体の作成は、通常の抗体作成と同様に、各種動物に対してイディオタイプ抗体又はイディオトープを接種して免疫し、抗イディオタイプ抗体を選別する方法が行われている。

このような抗イディオタイプ抗体は、様々な試薬として利用されているだけでなく、ワクチンへの応用も進められている。

しかし、従来の抗イディオタイプ抗体の作成方法では、1) 通常の抗体作成と同程度の時間と費用がかかる、2) 抗イディオタイプ抗体の選別が難しい、3) 作成の都度、動物を屠殺する必要がある、などの問題点があった。

発明の開示

本発明の目的は、従来の方法に比べて簡単且つ安価に作成することのできる抗イディオタイプ抗体、その作成方法、及び該抗イディオタイプ抗体を用いた目的とするイディオタイプ抗体の調製方法を提供することにある。

上記目的を達成するため、本発明の一つは、第1抗原に結合する第1抗体の抗イディオタイプ抗体であって、前記第1抗体の抗原結合部位に結合する物質と第2抗原とが連結された融合抗原と、前記第2抗原に結合する第2抗体とから構成されていることを特徴とする抗イディオタイプ抗体である。

本発明の抗イディオタイプ抗体においては、前記第1抗体の抗原結合部位に結合する物質は、前記第1抗原のエピトープであることが好ましい。

また、前記第1抗体の抗原結合部位に結合する物質は、タンパク質、ペプチド、糖、脂質、核酸又はそれらの複合体であることが好ましい。

更に、前記第1抗体の抗原結合部位に結合する物質は、スペーサーを介して前記第2抗原に連結されていることが好ましい。

本発明の抗イディオタイプ抗体は、第1抗体の抗原結合部位に結合する物質と第2抗原とが連結された融合抗原と、前記第2抗原に結合する第2抗体とから構成されているので、第1抗体のイディオトープに応じて前記第1抗体の抗原結合部位に結合する物質を変更するだけで、簡単に前記第1抗体の抗イディオタイプ抗体としての機能を付与することができる。

本発明のもう一つは、第1抗原に結合する第1抗体の抗イディオタイプ抗体の作成方法であって、前記第1抗体の抗原結合部位に結合する物質を調製し、該物質を第2抗原に連結して融合抗原を作成し、この融合抗原と前記第2抗原に結合する第2抗体とを結合させることを特徴とする、抗イディオタイプ抗体の作成方法である。

本発明の作成方法においては、前記第1抗原のエピトープを調製し、このエピトープを、前記第2抗原に連結することが好ましい。

また、前記第1抗体の抗原結合部位に結合するタンパク質、ペプチド、糖、脂質、核酸又はそれらの複合体を調製し、これを前記第2抗原に連結することが好ましい。

更に、前記第1抗体の抗原結合部位に結合する物質を、スペーサーを介して前記第2抗原に連結することが好ましい。

本発明の作成方法によれば、第1抗体のイディオトープに応じて前記第1抗体の抗原

結合部位に結合する物質を変更するだけで、第1抗体の抗イディオタイプ抗体を簡単且つ安価に得ることができる。

また、本発明のもう一つは、動物に、特定のイディオタイプ抗体に対する抗イディオタイプ抗体を接種した後、前記イディオタイプ抗体の抗原を接種することにより、前記イディオタイプ抗体を調製する方法において、前記抗イディオタイプ抗体として、請求項1～4のいずれか一つに記載の抗イディオタイプ抗体を用いることを特徴とするイディオタイプ抗体の調製方法である。

本発明の調製方法によれば、目的とするイディオタイプ抗体の抗イディオタイプ抗体を簡単に調製することができるので、イディオタイプ抗体の産生量を増加させることができ、目的とするイディオタイプ抗体を効率よく調製することができる。

図面の簡単な説明

図1は、第1抗原のエピトープを、そのまま第1抗体の抗原結合部位に結合する物質として用いて抗イディオタイプ抗体を作成する方法の説明図である。

図2は、第1抗体の抗原結合部位に結合するペプチドをファージディスプレイ法によりスクリーニングして調製し、これを用いて抗イディオタイプ抗体を作成する方法の説明図である。

図3は、マウス抗 His-Tag 抗体①～④が、ウサギ抗ペプチドA抗体に対する抗イディオタイプ抗体となっているかどうかを ELISA 法で確認した結果を示す図である。

図4は、マウス抗ビオチン抗体⑤～⑧が、ウサギ抗ペプチドC抗体に対する抗イディオタイプ抗体となっているかどうかを ELISA 法で確認した結果を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明の抗イディオタイプ抗体は、第1抗原に結合する第1抗体の抗イディオタイプ抗体であって、前記第1抗体の抗原結合部位に結合する物質と第2抗原とが連結された融合抗原と、前記第2抗原に結合する第2抗体とから構成されているものである。

本発明において、第1抗原は抗原として利用可能な物質であれば特に限定されるものではない。具体的には、抗体、タンパク質受容体、ホルモン、酵素、ペプチド、核酸、複合糖質、細胞、ウイルス、低分子化合物等が例示できる。

イディオタイプ抗体である第1抗体は、所定の第1抗原を用いて常法により調製して

もよく、種々の抗原に対する抗体が市販されているので、それらを用いることもできる。

第1抗体の抗原結合部位に結合する物質としては、具体的には、タンパク質、ペプチド、糖、脂質、核酸又はそれらの複合体等が例示できる。本発明においては、第1抗体の抗原結合部位が認識、結合する最小部分、すなわち前記第1抗原のエピトープであることが好ましい。このような抗原のエピトープは、文献等に記載された情報に基いて決定することができるが、例えば、第1抗体の抗原結合部位に結合する物質が、ペプチド又はタンパク質の場合は、ファージディスプレイ法 (Smith, G.P., Science, 288, 1315-1317 (1985)) によって得ることもできる。ファージディスプレイ法は、ファージの外殻タンパク質に外来タンパク質を融合タンパク質として提示させたファージライブラリーを用いて、所定のターゲット物質に結合するタンパク質をスクリーニングする方法であり、このようなファージライブラリーを第1抗体に接触させて、選択操作 (バイオパニング) を行なうことで、第1抗体に結合する外来タンパク質を発現したファージ群のみを選択的に得、このファージのDNAを解析することにより、ファージ表面に提示された外来タンパク質のアミノ酸配列を容易に同定することができる。そして、このアミノ酸配列に基いて、公知の方法 (固相法、Fmoc法等) によってペプチド又はタンパク質を合成することにより、目的のペプチド又はタンパク質を簡単、且つ大量に調製することができる。第1抗体の抗原結合部位に結合するペプチド又はタンパク質のアミノ酸配列やアミノ酸数は第1抗体によって変わるため一概に決定できないが、例えば、ペプチドの場合、通常、2~200個のアミノ酸からなるペプチドが好ましく、5~18個のアミノ酸からなるペプチドがより好ましい。

ファージライブラリーは、例えば、Smith, G.P., Science, 288, 1315-1317 (1985)、J.K. Scott and G.P. Smith, Science, 249, 386-390 (1990)等に記載された方法にしたがって、ランダム化したDNAを化学合成し、これをファージDNAの外殻タンパク質をコードする遺伝子に挿入し、このDNAを大腸菌に導入することにより調製することもできるが、商品名「Phage Display Peptide Library Kit」、New England Biolab社製)等の市販のものを用いることもできる。

本発明においては、第1抗体の抗原結合部位に結合するペプチド又はタンパク質を効率よくスクリーニングするために、ファージ表面に提示される外来タンパク質のバリエーションをできるだけ増やしたファージライブラリーを用いることが好ましい。

本発明において、第2抗原は、前記第1抗体の抗原結合部位に結合する物質を化学的、

物理的に連結することのできる物質であれば特に制限されないが、具体的には、ペプチド（例えば、ヒスチジンが数個アミノ結合した His-Tag 等）、糖、核酸、脂質及びこれらの複合体、ビオチン等が例示できる。なお、第 2 抗原に対する抗体、すなわち第 2 抗体が入手しやすいものであることが好ましい。

上記第 1 抗体の抗原結合部位に結合する物質と第 2 抗原を連結する方法は、該物質及び第 2 抗原の種類によって異なるため一概に言えないが、それぞれの種類に応じて公知の方法で連結すればよい。例えば、第 1 抗体の抗原結合部位に結合する物質及び第 2 抗原としてペプチドを用いる場合は、以下のような方法が挙げられる。

1) 第 1 抗体の抗原結合部位に結合するペプチドと第 2 抗原であるペプチドとを連続した一つのペプチドとして合成する。

2) 第 2 抗原であるペプチドにアミノ基、チオール基やカルボキシル基等の官能基を有するアミノ酸を付加したペプチドを合成し、そのアミノ基やチオール基等を活性化して、第 1 抗体の抗原結合部位に結合するペプチドを連結する。

本発明においては、第 1 抗体の抗原結合部位に結合する物質と第 2 抗原とを連結する際に、スペーサーを介して連結することが好ましい。スペーサーとしては、第 1 抗体の抗原結合部位に結合する物質と第 2 抗原とを化学的、物理的に連結できる物質であれば特に制限はなく、具体的には、ペプチド、炭素数 2～18 の主鎖（主鎖中にエステル結合やエーテル結合を有していてもよい。）を有し、好ましくは水酸基等の親水性の官能基を有するもの（例えば、両末端に活性基を有するポリビニルアルコール、好ましくはビニルアルコール分子が 2～10 程度重合したもの）、2～10 糖からなる糖鎖等が例示できる。上記ペプチドとしては、グリシンやセリンが数個（通常 4～10 個）ペプチド結合したペプチド等のフレキシブルリンカー等が好ましく挙げられる。

このようなスペーサーを介して連結することにより、前記第 1 抗体の抗原結合部位に結合するペプチドと第 1 抗体との立体的な結合障害を回避することができる。スペーサーの長さは、前記第 1 抗体の抗原結合部位に結合するペプチドと第 1 抗体との立体的な結合障害を回避するのに十分な長さを適宜選択すればよい。

なお、スペーサーは、予め第 1 抗体の抗原結合部位に結合する物質に連結してから第 2 抗原と連結してもよく、予め第 2 抗原に連結してから第 1 抗体の抗原結合部位に結合する物質と連結してもよい。スペーサーと、第 1 抗体の抗原結合部位に結合する物質又は第 2 抗原との連結は、公知の方法（大野素徳・金岡祐一・崎山文夫・前田浩 著、

「生物化学実験法 13 蛋白質の化学修飾（下）」（学会出版センター）、81～113頁等参照）で行うことができる。

また、上記第2抗原に結合する第2抗体は、入手が容易なものが好ましく、目的等に応じてマウス抗体、ウサギ抗体、ヒト抗体等を選択して用いることができる。

本発明の抗イディオタイプ抗体は、上記のようにして第1抗体の抗原結合部位に結合する物質と第2抗原とを連結した融合抗原と、前記第2抗原に対する第2抗体とを抗原抗体反応により結合させることにより得ることができる。

以下、本発明の抗イディオタイプ抗体の作成方法について、図1、2を参照して更に詳細に説明する。

図1は、第1抗原のエピトープを、そのまま第1抗体の抗原結合部位に結合する物質として用いて抗イディオタイプ抗体を作成する方法について説明したものである。この方法は、第1抗原のエピトープが既に分かっており、該エピトープを公知の方法で調製できる場合に有効な方法である。

すなわち、第1抗原1のエピトープ2を、常法にしたがって解析した結果に基づいて、あるいは文献情報等に基づいて公知の方法で合成又は調製する。そして、このエピトープ2を第2抗原21に直接連結することにより融合抗原23を作成し、この融合抗原23と第2抗原21に対する第2抗体20とを抗原抗体反応により結合させることにより、第1抗体10に対する抗イディオタイプ抗体31を作成することができる。また、エピトープ2と第2抗原21とを、スペーサー22を介して連結した融合抗原24を用いることにより、抗イディオタイプ抗体32を作成することができ、融合抗原23と24の両方を用いることにより、抗イディオタイプ抗体33を作成することができる。

このようにして得られた抗イディオタイプ抗体31～33は、図に示すように、第1抗体10の抗原結合部位11に、エピトープ2を介して結合することができる。

図2は、第1抗体の抗原結合部位に結合する物質、すなわち第1抗体のエピトープ解析をファージディスプレイ法により行ない、その解析結果に基づいて第1抗体の抗原結合部位に結合するペプチドを調製し、抗イディオタイプ抗体を作成する方法について説明したものである。この方法は、第1抗体（イディオタイプ抗体）が既に得られている場合に有効な方法である。なお、以下の説明において、上記の説明と実質的に同じものには同一の符号を附し、その説明を省略する。

すなわち、第1抗体12の抗原結合部位13に結合するペプチド3を提示したファ-

ジ4を、ファージディスプレイ法によりスクリーニングし、そのアミノ酸配列を解析して公知の方法でペプチド3を合成する。そして、ペプチド3を第2抗原21に直接連結することにより融合抗原25を作成し、この融合抗原25と第2抗原21に対する第2抗体20とを抗原抗体反応により結合させることにより、抗イディオタイプ抗体34を作成することができる。また、ペプチド3と第2抗原21とを、スペーサー22を介して連結した融合抗原26を用いることにより、抗イディオタイプ抗体35を作成することができ、融合抗原25と26の両方を用いることにより、抗イディオタイプ抗体36を作成することができる。

このようにして得られた抗イディオタイプ抗体34～36は、図に示すように、第1抗体12の抗原結合部位13に、ペプチド3を介して結合することができる。

本発明の抗イディオタイプ抗体は、従来の抗イディオタイプ抗体の代替として様々な用途に用いることが可能であり、例えば、各種の検出・測定試薬、ワクチン等の医薬品へ利用することができる。

また、「免疫学イラストレイテッド」(117頁、多田富雄監訳、南江堂、2000年2月10日発行)等に記載されているように、動物に、特定のイディオタイプ抗体に対する抗イディオタイプ抗体を適量接種した後、前記イディオタイプ抗体の抗原(第1抗原)を接種することにより、前記イディオタイプ抗体の産生量が大幅に増加することが知られている。したがって、上記のようなイディオタイプ抗体の調製方法において、本発明の抗イディオタイプ抗体を用いることにより、目的とするイディオタイプ抗体を効率よく調製することができる。なお、上記動物としては、通常、抗体を作成するときに用いられるマウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ウマ、ウシ、ブタ、ニワトリ、ヒト等が例示できる。

実施例

以下、実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例1

任意のペプチド、具体的には配列番号1に示すペプチド(以下、ペプチドAという)を第1抗原として用い、一般的な抗ペプチド抗体作成方法にしたがってウサギを免疫し、3回の試験採血の後、十分な量の抗ペプチドA抗体が得られたため、採血後、ペプチドAをカラムに固定化し、ウサギ抗ペプチドA抗体(第1抗体)を精製した。

ペプチドAのC末端側に、ヒスチジンが4個ペプチド結合したペプチドである His-Tag (第2抗原) を連結したペプチド①、及びペプチドAのC末端側に2つのセリンをスペーサーとして挿入し、その後に His-Tag を連結したペプチド②をそれぞれ常法にしたがって合成した。また、対照として、配列番号2に示すペプチド (以下、ペプチドBという) のC末端側に His-Tag を連結したペプチド③、及びペプチドBのC末端側に2つのセリンをスペーサーとして挿入し、その後に His-Tag を連結したペプチド④をそれぞれ合成した。

上記ペプチド①～④を、His-Tag に結合するマウス抗体 (第2抗体、商品名「Anti-Histag Antibody」、CN Bioscience Inc 製) と抗原抗体反応により結合させた。以下、ペプチド①を結合させたマウス抗 His-Tag 抗体をマウス抗 His-Tag 抗体①、ペプチド②を結合させたマウス抗 His-Tag 抗体をマウス抗 His-Tag 抗体②、ペプチド③を結合させたマウス抗 His-Tag 抗体をマウス抗 His-Tag 抗体③、ペプチド④を結合させたマウス抗 His-Tag 抗体をマウス抗 His-Tag 抗体④という。

そして、マウス抗 His-Tag 抗体①～④が、ウサギ抗ペプチドA抗体に対する抗イディオタイプ抗体となっているかどうかを、ELISA 法を用いて確認した。具体的には、ウサギ抗ペプチドA抗体を $10\mu\text{g/ml}$ となるように 100mM 炭酸ナトリウムバッファ ($\text{pH}8.0$) に溶解し、コーニング社製96穴プレート (高結合タイプ) に1ウェルあたり $100\mu\text{l}$ ずつ加え、 25°C で1時間放置し、物理吸着による固定化を行った。プレートを洗浄後、2% (w/v) スキムミルク溶液 (100mM 炭酸ナトリウムバッファ ($\text{pH}8.0$)) を1ウェルあたり $250\mu\text{l}$ 加えてブロッキングした。また、対照として、ウサギ抗ペプチドA抗体を固定化せず、2% (w/v) スキムミルク溶液 (100mM 炭酸ナトリウムバッファ ($\text{pH}8.0$)) を $250\mu\text{l}$ 加えてブロッキングしたウェルを作成した。

マウス抗 His-Tag 抗体①～④を、それぞれ $1\mu\text{g/ml}$ となるように 2% (w/v) スキムミルク溶液 (100mM 炭酸ナトリウムバッファ ($\text{pH}8.0$)) に溶解し、 $200\mu\text{l}$ ずつウサギ抗ペプチドA抗体固定化ウェル3つ、ブロッキングのみのウェル2つに加え、 25°C で1時間放置した。プレートを洗浄後、HRP で標識した抗マウス抗体を加え、 25°C で1時間放置し、更に洗浄後、ABTS 反応液を加え、 405nm の吸光度で融合抗体の結合量を測定し、吸光度比 (ウサギ抗ペプチドA抗体固定化ウェル3つの吸光度の平均値/ブロッキングのみのウェル2つの吸光度の平均値) を求めた。その結果を図3に示す。

図3から、マウス抗 His-Tag 抗体①、②は、ウサギ抗ペプチドA抗体との結合が見

られ、ウサギ抗ペプチドA抗体の抗イディオタイプ抗体であることが示された。特に、スパーサーを入れたマウス抗 His-Tag 抗体②は、スパーサーのないマウス抗 His-Tag 抗体①に比べて、ウサギ抗ペプチドA抗体とより結合しやすくなっていることが分かる。

実施例 2

任意のペプチド、具体的には配列番号 3 に示すペプチド（以下、ペプチドCという）を第 1 抗原として用い、実施例 1 と同様にしてペプチドCに結合する抗体（第 1 抗体、以下、ウサギ抗ペプチドC抗体という）を精製した。

ペプチドCのN末端側にビオチン（第 2 抗原）を直接連結したペプチド⑤、及びペプチドCのN末端側に商品名「sulfo NHS-LC-Biotin」（ピアース社製）を用いてスパーサーを介してビオチンを連結したペプチド⑥を調製した。また、対照として、上記ペプチドBのN末端側にビオチンを直接連結したペプチド⑦、及びペプチドBのN末端側に商品名「sulfo NHS-LC-Biotin」（ピアース社製）を用いてスパーサーを介してビオチンを連結したペプチド⑧を調製した。

上記ペプチド⑤～⑧を、ビオチンに結合するマウス抗体（第 2 抗体、商品名「anti Biotin antibody」、Dianova GmbH 社製）と抗原抗体反応により結合させた。以下、ペプチド⑤を結合させたマウス抗ビオチン抗体をマウス抗ビオチン抗体⑤、ペプチド⑥を結合させたマウス抗ビオチン抗体をマウス抗ビオチン抗体⑥、ペプチド⑦を結合させたマウス抗ビオチン抗体をマウス抗ビオチン抗体⑦、ペプチド⑧を結合させたマウス抗ビオチン抗体をマウス抗ビオチン抗体⑧という。

そして、マウス抗ビオチン抗体⑤～⑧が、ウサギ抗ペプチドC抗体に対する抗イディオタイプ抗体となっているかどうかを、実施例 1 と同様にして ELISA 法を用いて確認した。その結果を図 4 に示す。

図 4 から、マウス抗ビオチン抗体⑤、⑥は、ウサギ抗ペプチドC抗体との結合が見られ、ウサギ抗ペプチドC抗体の抗イディオタイプ抗体であることが示された。特に、スパーサーを入れたマウス抗ビオチン抗体⑥は、スパーサーのないマウス抗ビオチン抗体⑤に比べて、ウサギ抗ペプチドC抗体とより結合しやすくなっていることが分かる。今回は、第 2 抗原としてビオチンのように小さいものを用いたため、スパーサーの効果が大きく現れたと考えられる。

「配列表フリーテキスト」

配列番号 1 : 第 1 抗原として用いたペプチド。

配列番号 2 : 第 1 抗体の抗原結合部位に結合しないペプチド。

配列番号 3 : 第 1 抗原として用いたペプチド。

産業上の利用可能性

以上説明したように本発明によれば、第 1 抗体の抗原結合部位に結合する物質を調製し、該物質を第 2 抗原に連結して融合抗原を作成し、この融合抗原と前記第 2 抗原に結合する第 2 抗体とを結合させることにより、前記第 1 抗体に対する抗イディオタイプ抗体を簡便且つ安価に得ることができる。

本発明の抗イディオタイプ抗体は、例えば、各種の検出・測定試薬、ワクチン等の医薬品へ利用することができる。また、上述したように、本発明の抗イディオタイプ抗体を用いることにより、目的とするイディオタイプ抗体を効率よく調製することができる。

請 求 の 範 囲

1. 第1抗原に結合する第1抗体の抗イディオタイプ抗体であって、前記第1抗体の抗原結合部位に結合する物質と第2抗原とが連結された融合抗原と、前記第2抗原に結合する第2抗体とから構成されていることを特徴とする抗イディオタイプ抗体。
2. 前記第1抗体の抗原結合部位に結合する物質は、前記第1抗原のエピトープである、請求項1に記載の抗イディオタイプ抗体。
3. 前記第1抗体の抗原結合部位に結合する物質は、タンパク質、ペプチド、糖、脂質、核酸又はそれらの複合体である、請求項1又は2に記載の抗イディオタイプ抗体。
4. 前記第1抗体の抗原結合部位に結合する物質は、スペーサーを介して前記第2抗原に連結されている、請求項1～3のいずれか一つに記載の抗イディオタイプ抗体。
5. 第1抗原に結合する第1抗体の抗イディオタイプ抗体の作成方法であって、前記第1抗体の抗原結合部位に結合する物質を調製し、該物質を第2抗原に連結して融合抗原を作成し、この融合抗原と前記第2抗原に結合する第2抗体とを結合させることを特徴とする、抗イディオタイプ抗体の作成方法。
6. 前記第1抗原のエピトープを調製し、このエピトープを、前記第2抗原に連結する、請求項5に記載の抗イディオタイプ抗体の作成方法。
7. 前記第1抗体の抗原結合部位に結合するタンパク質、ペプチド、糖、脂質、核酸又はそれらの複合体を調製し、これを前記第2抗原に連結する、請求項5又は6に記載の抗イディオタイプ抗体の作成方法。
8. 前記第1抗体の抗原結合部位に結合する物質を、スペーサーを介して前記第2抗原に連結する、請求項5～7のいずれか一つに記載の抗イディオタイプ抗体の作成方法。
9. 動物に、特定のイディオタイプ抗体に対する抗イディオタイプ抗体を接種した後、前記イディオタイプ抗体の抗原を接種することにより、前記イディオタイプ抗体を調製する方法において、前記抗イディオタイプ抗体として、請求項1～4のいずれか一つに記載の抗イディオタイプ抗体を用いることを特徴とするイディオタイプ抗体の調製方法。

図1

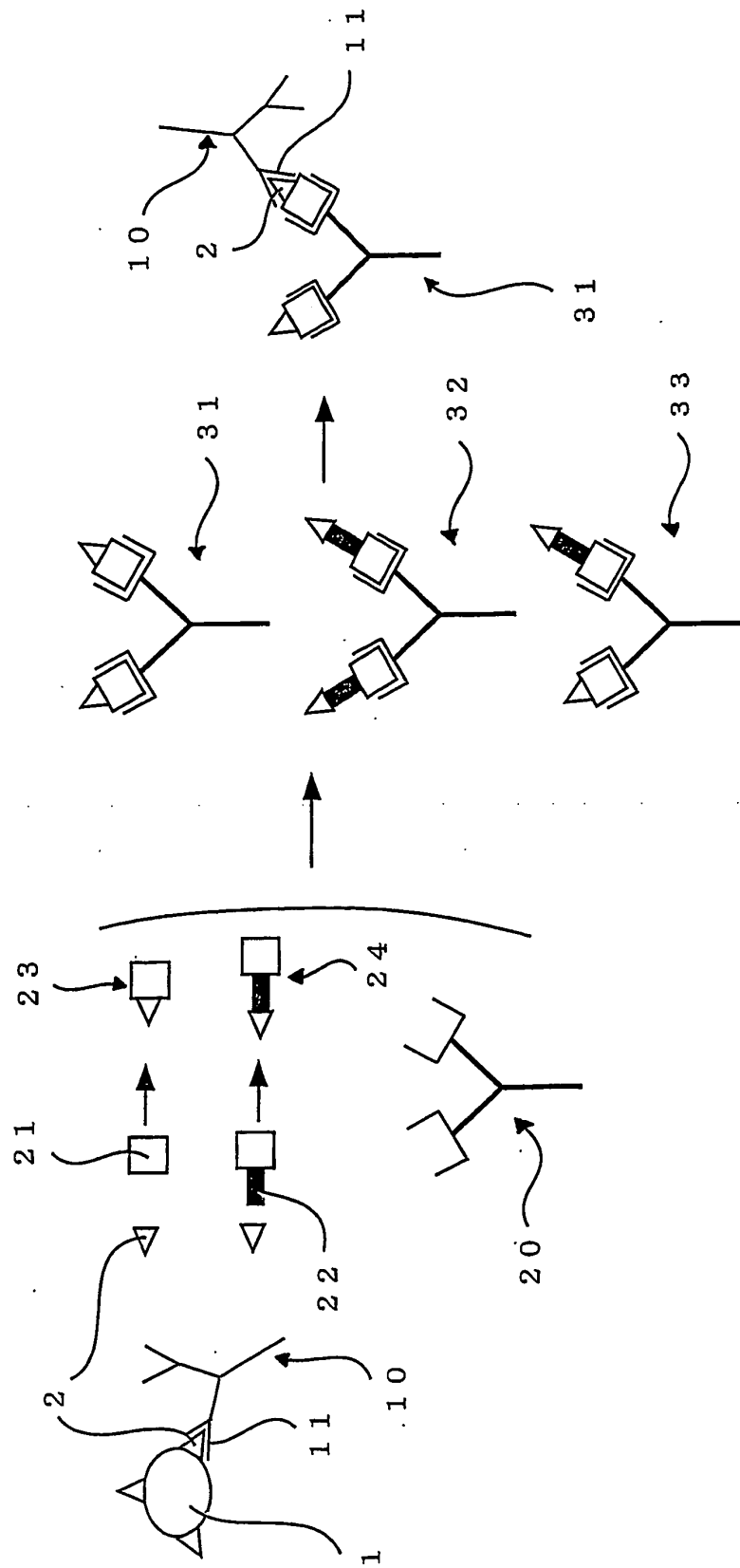


図 2

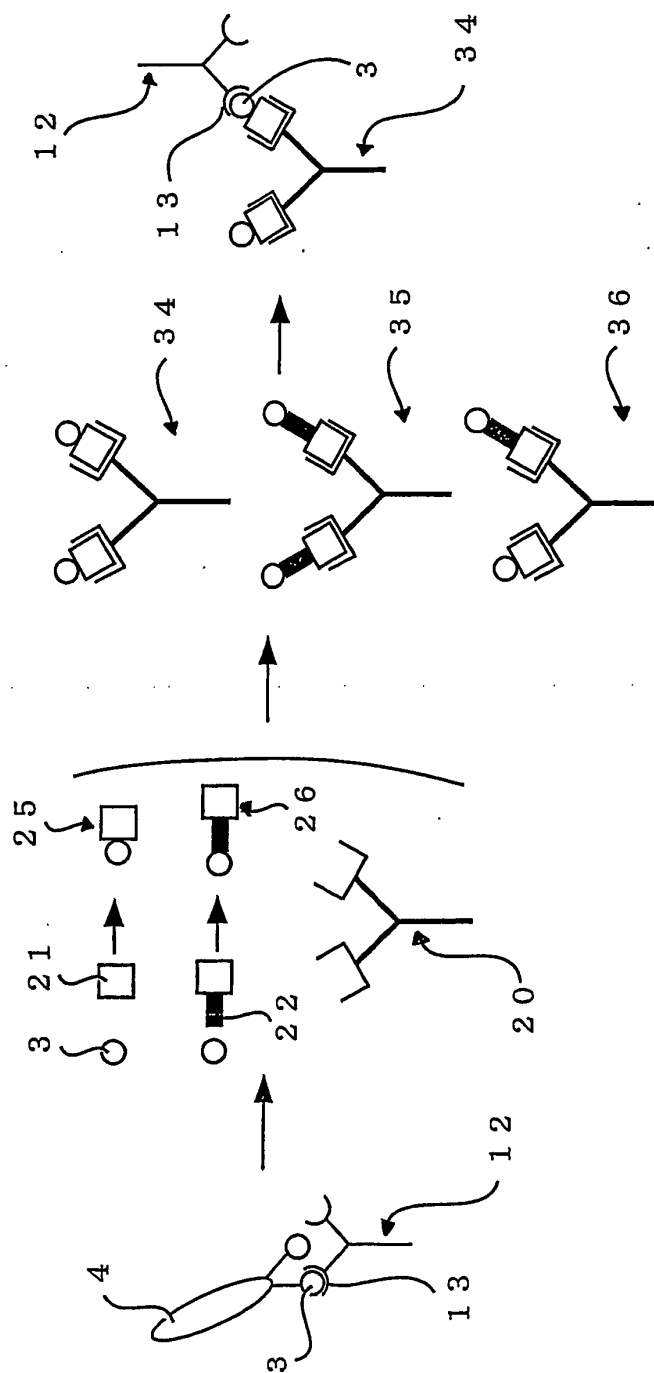


図 3

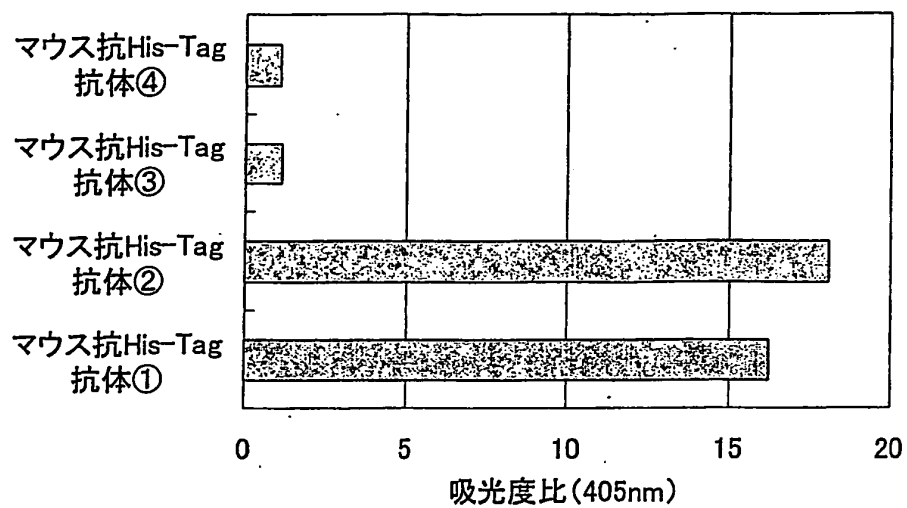
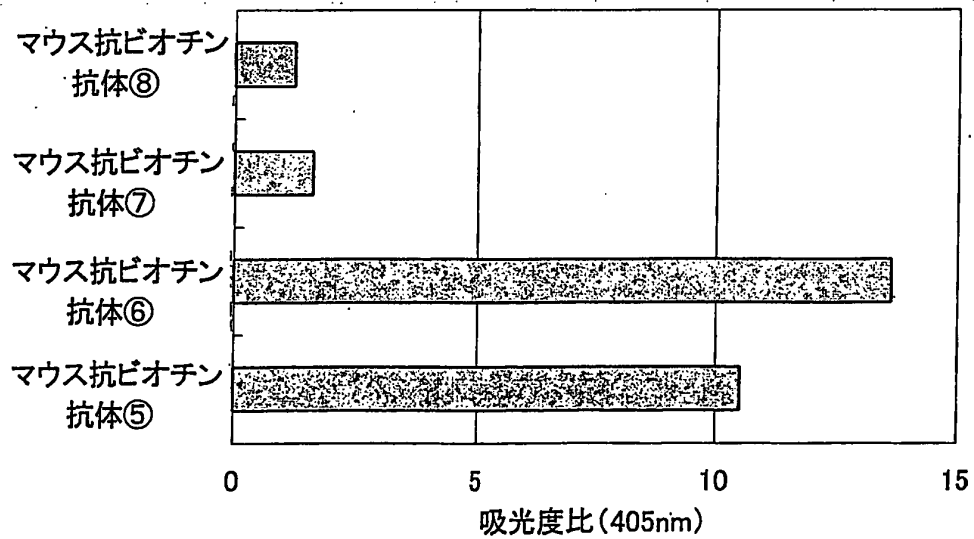


図 4



SEQUENCE LISTING

<110> PEPTIDE DOOR CO., LTD.

<120> Anti-idiotypic antibody, method for producing the anti-idiotypic antibody, and method for preparing idiotype antibody using the anti-idiotypic antibody

<130> PCT-PD-2

<150> JP 2002-241695

<151> 2002-8-22

<160> 3

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide used as a first antigen

<400> 1

Arg Thr Met Pro Ser Trp Gly Lys Ile Phe
1 5 10

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide not bound to an antigen binding site of a first antibody

<400> 2

Met Ser Asp Arg Lys Pro Glu Ser Gly Ser
1 5 10

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Peptide used as a first antigen

<400> 3

Thr Asp Phe Pro Gly Leu Leu Ser Tyr Trp
1 5 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10671

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07K16/42, C07K19/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07K16/42, C07K19/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA(STN), BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG), JSTPLUS FILE(JOIS),
SwissProt/PIR/Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 745612 A1 (MERCK PATENT GmbH.), 04 December, 1996 (04.12.96), & US 5969107 A & JP 8-325299 A	1-9
A	TARAR M.R. et al., Expression of a human cytomegarovirus gp58 antigenic domain fused to the hepatitis B virus nucleocapsid protein., FEMS Immunology and Medical Microbiology, 1996, Vol.16, No.3-4, pages 183 to 192	1-9

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not
considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing
date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is
cited to establish the publication date of another citation or other
special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other
means

"P" document published prior to the international filing date but later
than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or
priority date and not in conflict with the application but cited to
understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered novel or cannot be considered to involve an inventive
step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered to involve an inventive step when the document is
combined with one or more other such documents, such
combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
18 September, 2003 (18.09.03)

Date of mailing of the international search report
07 October, 2003 (07.10.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C07K16/42, C07K19/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C07K16/42, C07K19/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), JSTPLUS ファイル (JOIS)

SwissProt/PIR/Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	EP 745612 A1 (MERCK PATENT GmbH) 1996. 12. 04 & US 5969107 A & JP 8-325299 A	1-9
A	TARAR M. R. et al., Expression of a human cytomegarovirus gp58 antigenic domain fused to the hepatitis B virus nucleocapsid protein., FEMS Immunology and Medical Microbiology, 1996, Vol. 16, No. 3-4, p. 183-192	1-9

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

18. 09. 03

国際調査報告の発送日

07.10.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鈴木 恵理子



4B

3037

電話番号 03-3581-1101 内線 3488